

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik  
in Frankfurt/Main

Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff

---

VERGLEICHSWEISE BESTIMMUNG VON 17,21-  
DIHYDROXY-20-KETOSTEROIDEN IM MENSCH-  
LICHEN PLASMA MIT EINER KOLORIMETRISCHEN  
UND EINER ENZYMATISCHEN METHODE BEI  
NORMALER UND PATHOLOGISCH VERÄNDERTER  
NEBENNIERENRINDENFUNKTION.

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
der hohen medizinischen Fakultät der  
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main

vorgelegt von  
Eckhard Kollatz  
aus Königsberg (Pr.)

Frankfurt/Main 1965



Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik  
in Frankfurt/Main

Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff

---

VERGLEICHSWEISE BESTIMMUNG VON 17,21-  
DIHYDROXY-20-KETOSTEROIDEN IM MENSCH-  
LICHEN PLASMA MIT EINER KOLORIMETRISCHEN  
UND EINER ENZYMATISCHEN METHODE BEI  
NORMALER UND PATHOLOGISCH VERÄNDERTER  
NEBENNIERENRINDENFUNKTION.

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
der hohen medizinischen Fakultät der  
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main

vorgelegt von  
Eckhard Kollatz  
aus Königsberg (Pr.)

Frankfurt/Main 1965

Referent: Prof. Dr. E. F. Pfeiffer  
Koreferent: Privatdozent Dr. W. Seubert  
Tag der mündlichen Prüfung: 26. 3. 1965

Dem verstorbenen Privatdozenten

Dr. med. Hans Joachim Hübener

in dankbarer Verehrung gewidmet

- Herrn Prof. Dr. E. F. Pfeiffer, I. Medizinische  
Universitätsklinik, Frankfurt am Main, danke ich  
für die Fragestellung und die Unterstützung bei  
der Durchführung der Untersuchungen und der Zusammen-  
stellung der Ergebnisse.

Dem verstorbenen Privatdozenten Dr. med. H. J.  
Hübener, Assistent am Institut für Vegetative  
Physiologie, Frankfurt am Main, danke ich für die  
Überlassung der Ergebnisse der enzymatischen 17,21-  
Dihydroxy-20-Ketosteroid-Bestimmungen.

# INHALTSÜBERSICHT

|                                                                                        |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. <u>EINLEITUNG</u>                                                                   | S. 1  |
| B. <u>METHODIK</u>                                                                     | S. 3  |
| 1. Kolorimetrische Bestimmung von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma           | S. 3  |
| a) Lösungen und Reagenzien                                                             | S. 3  |
| b) Analysengang                                                                        | S. 4  |
| c) Prinzip und Spezifität der kolorimetrischen Methode                                 | S. 6  |
| 2. Enzymatische Bestimmung von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma              | S. 7  |
| a) Lösungen und Reagenzien                                                             | S. 7  |
| b) Analysengang                                                                        | S. 8  |
| c) Prinzip und Spezifität der enzymatischen Methode                                    | S. 11 |
| 3. Allgemeine Versuchsanordnung                                                        | S. 12 |
| C. <u>ERGEBNISSE</u>                                                                   | S. 14 |
| 1. Plasma-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei normaler NNR-Funktion vor und unter ACTH | S. 14 |
| a) 9 <sup>00</sup> Uhr-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei Stoffwechselgesunden        | S. 14 |
| b) Verhalten der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei Stoffwechselgesunden unter ACTH   | S. 14 |
| 2. Plasma-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei NNR-Unterfunktion vor und unter ACTH     | S. 15 |
| a) bei primärer NNR-Unterfunktion (Morbus Addison)                                     | S. 15 |
| b) bei sekundärer NNR-Unterfunktion (Sheehan-Syndrom)                                  | S. 16 |
| 3. Plasma-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei NNR-Überfunktion vor und unter ACTH      | S. 17 |
| a) bei Cushing-Syndrom                                                                 | S. 17 |
| b) bei adrenogenitalem Syndrom                                                         | S. 19 |
| c) bei NNR-Carcinom                                                                    | S. 20 |
| D. <u>DISKUSSION</u>                                                                   | S. 21 |
| E. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>                                                              | S. 27 |
| <u>ABBILDUNGEN</u>                                                                     | S. 28 |
| <u>LITERATUR</u>                                                                       | S. 41 |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## A. E I N L E I T U N G

Auf die Bestimmung von Nebennierenrinden (NNR)-Steroiden im Blut kann beim Studium der normalen und der pathologisch veränderten NNR-Funktion nicht verzichtet werden. Sie stellt eine direktere Messung der inkretorischen Aktivität zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt dar und entwirft in gewissen klinischen Situationen ein genaueres Bild der Kapazität der NNR als etwa 24-Stundenwerte bei Bestimmung der im Urin ausgeschiedenen Metabolite.

Als besonders geeignet, den Funktionszustand und die Funktionsreserve der NNR zu erfassen, erwies sich die Bestimmung der NNR-Hormone vor, während und nach Stimulierung mittels einer mehrstündigen ACTH-Infusion (E i k - N e s, S a n d b e r g, T y l e r, S a m u e l s, B l i s s, N e l s o n, M i g e o n, P f e i f f e r).

Es gibt heute bereits zahlreiche Methoden zur quantitativen Bestimmung der 17-Hydroxy-Corticosteroide im menschlichen Plasma. Den meisten der Verfahren liegt die Porter-Silber-Reaktion - eine Reaktion der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide mit Phenylhydrazin - zu Grunde. Für den klinischen Routinebetrieb erwies sich das Verfahren in der Modifikation von Silber und Bush (1956) als besonders brauchbar, das - wiederum mit verschiedenen Modifikationen - auch von uns verwandt wurde.

Die Entwicklung einer grundsätzlich anderen, nämlich einer enzymatischen Methode zur quantitativen Bestimmung von NNR-Steroiden wurde erst möglich, nachdem es H ü b e n e r 1958 gelungen war, aus dem Mycel von Streptomyces hydrogenans eine 20 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase zu extrahieren, anzureichern und zu

kristallisieren (H ü b e n e r, L e h m a n n, 1958). Es lag nahe, diese neue enzymatische Bestimmungsmethode von NNR-Steroiden nun im Hinblick auf ihre klinische Brauchbarkeit zu prüfen, zumal sich auf vielen Gebieten der Analyse und Synthese enzymatische Verfahren wegen ihrer hohen Spezifität immer mehr durchsetzen.

In der vorliegenden Arbeit werden - im Anschluß an eine ausführliche Beschreibung der angewandten kolorimetrischen und enzymatischen Methode - erste Ergebnisse von Paralleluntersuchungen an klinischem Material veröffentlicht und besprochen. Bei getrennter Bestimmung der gleichen Plasmaproben mit zwei Methoden und in zwei verschiedenen Laboratorien <sup>1)</sup>, ohne Kenntnis des Resultats der anderen Seite, bestand die Hoffnung, zu objektiven Einblicken in die Brauchbarkeit der neuen Technik zu kommen.

---

1) Die enzymatischen Analysen wurden freundlicherweise von dem verstorbenen Privatdozenten Dr. H. J. H ü b e n e r im Institut für Vegetative Physiologie, Frankfurt am Main, selbst durchgeführt.

## B. M E T H O D I K

### 1. Kolorimetrische Bestimmung von 17,21-Dihydroxy- 20-Ketosteroiden im Plasma.

Die kolorimetrischen Bestimmungen wurden mit einem modifizierten Silber-Bush-Verfahren (S i l b e r, B u s h, 1956) durchgeführt, das im folgenden beschrieben wird:

#### a) Lösungen und Reagenzien:

Methylenchlorid (Merck Nr. 6050), zusätzlich gereinigt mit Hilfe einer 1 m langen Säule von farblosem Kieselgel (P e t e r s , B i e r i c h).

Tetrachlorkohlenstoff (Merck Nr. 2222)

Petroläther, S. P. 35 bis 70° C (Merck Nr. 913)

Äthanol (Merck Nr. 972)

Phenylhydrazinhydrochlorid (Merck Nr. 7253) wurde unter Zusatz von Aktivkohle aus einer alkoholischen Lösung umkristallisiert. Es wurde mehrmals filtriert, die Kristalle in einer Filternutsche mit Äthanol ausgewaschen und anschließend im Exsikkator über Kalziumchlorid getrocknet.

Schwefelsäure, 310 ml konzentrierte Schwefelsäure (Merck-Nr. 731), gelöst in 190 ml Aqua bidestillata.

Leer-Reagenz (LR), 100 ml Schwefelsäure + 50 ml Äthanol.

Phenylhydrazin-Schwefelsäure-Reagenz (PSR), 65 mg Phenylhydrazinhydrochlorid wurden in 150 ml LR gelöst.

Natronlauge, 1/10 normal, (Merck Nr. 9141)

Natriumsulfat, wasserfrei, (Merck Nr. 6649)

Titriplex III (Merck Nr. 8418)

Cortisolösung, 5 mg Cortisol (freier Alkohol) wurden in 10 ml Äthanol gelöst und diese Lösung im Meßkolben mit Aqua bidestillata auf 100 ml aufgefüllt.

Hiervon wurden Verdünnungen hergestellt, die etwa 10 Tage benutzt wurden ( $1\frac{1}{2}$ /ml).

b) Analysengang:

12 ml Plasma wurden in 50 ml-Schliffzentrifugengläser pipettiert, die wie alle Glas- und sonstigen Geräte nach normaler Reinigung zusätzlich mit Aqua destillata, Äthanol und Methylenchlorid ausgespült worden waren. Zu dem Plasma wurden 30 ml Tetrachlorkohlenstoff hinzugefügt, die Röhrchen mit Kautexstopfen fest verschlossen und 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Die Tetrachlorkohlenstoffphase wurde abzentrifugiert, mit der Wasserstrahlpumpe unter Verwendung einer langen Kanüle ( $V_2A$ ) abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde der Plasmarückstand in derselben Art mit Petroläther gewaschen und die Petrolätherphase verworfen.

Je 10 ml des so behandelten Plasmas wurden in saubere Schliffzentrifugengläser überführt und mit 25 ml Methylenchlorid durch 30 Sekunden langes, kräftiges Schütteln extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Röhrchen solange in eine Kältemischung gestellt, bis die wässrige (Plasma-)Phase gefroren war. Hierauf wurde nochmals zentrifugiert und dann der Methylenchloridextrakt mittels einer langen Kanüle, die durch die gefrorene wässrige Schicht gestoßen wurde, mit einer 50 ml-Glasspritze in ein weiteres Schliffzentrifugenglas überführt, das mit einem Eichstrich bei 10 ml versehen war. Dieses Zentrifugenglas mit dem ersten Methylenchloridextrakt wurde mit einem Abdampfansatz versehen, an den eine Saugpumpe angeschlossen war. Im Wasserbad von  $40^{\circ}C$  wurde so das Volumen auf ca.  $\frac{1}{3}$  reduziert. In der Zwischenzeit wurde die aufgetaute wässrige Plasmaphase in oben beschriebener Art und Weise einer nochmaligen Extraktion mit 10 ml Methylenchlorid unterzogen. Der zweite Methylenchloridextrakt wurde mit derselben Spritze zu dem ersten - im Wasserbad befindlichen - hinzugefügt, und das Volumen auf genau 10 ml eingeeengt,

d. h., wenn zuviel Methylenchlorid abgedampft wurde, mußte mit Methylenchlorid auf genau 10 ml aufgefüllt werden. Dieser Extrakt von 10 ml wurde jetzt mit 1 ml  $1/10$  normaler Natronlauge 15 Sekunden kräftig geschüttelt, anschließend zentrifugiert und die NaOH-Phase mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der nach der Alkaliwaschung farblose Extrakt wurde über ein Filter, auf das wasserfreies Natriumsulfat in dünner Schicht aufgetragen war, in ein Reagenzglas überführt.

Je 4 ml des Extraktes wurden dann in 2 15 ml-Zentrifugengläser überführt, und das erste mit 1 ml PSR, das zweite mit 1 ml LR 15 Sekunden lang geschüttelt, dann zentrifugiert und die Methylenchloridphase mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Ansätze blieben über Nacht stehen.

Am nächsten Morgen wurden die Lösungen am Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von  $405\text{ m}\mu$  unter Benutzung von 10 mm-Küvetten photometriert; wobei zunächst PSR- und LR-Lösung gegen Aqua bidestillata und anschließend PSR- gegen die entsprechende LR-Lösung abgelesen wurden. Diese doppelte Ablesung wurde deshalb vorgenommen, weil die Ablesung von PSR- und LR-Lösung gegen Wasser eventuelle extinktionsgebende Verunreinigungen anzeigt, wogegen eine Ablesung von PSR- gegen die entsprechende LR-Lösung Chromogene ausschließt, die sich unter der Einwirkung von Schwefelsäure auf den Plasmaextrakt bilden können.

Aus beiden Werten, die zumeist übereinstimmten, beziehungsweise nahe beieinander lagen, wurde ein Extinktionsmittelwert gebildet.

In einem Arbeitsgang wurden jeweils 6 Plasmaproben und 2 2 $\gamma$ -Standards (2 $\gamma$ -Cortisol, gelöst in 10 ml Aqua bidestillata) verarbeitet, die genau wie die Plasmaproben behandelt wurden und deren Extinktionsmittel-

wert der Berechnung des  $\gamma$ -17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroid-Gehaltes pro 100 ml Plasma zu Grunde gelegt wurde:

$$\frac{20}{\gamma\text{-Standard-Extinktionsmittelwert}} \cdot \text{Extinktionsmittelwert der Plasmaprobe} =$$

$$= \gamma\text{-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide/100 ml Plasma.}$$

### c) Prinzip und Spezifität der kolorimetrischen Methode.

Phenylhydrazin reagiert mit 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden (Cortison, Cortisol, Tetrahydrocortison, Tetrahydrocortisol, Reichsteins Verbindung S) unter Bildung von farbigen Diphenylhydrazonen, deren Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 410 m $\mu$  liegt (Porter, Silber, 1950).

Im Verlauf dieser Reaktion tritt zwischen Kohlenstoffatom 16 und 17 eine Doppelbindung auf, indem ein Molekül Wasser austritt. Das Auftreten dieser Doppelbindung unter H<sub>2</sub>O-Austritt kann ausschließlich bei 17-OH-Corticosteroiden erfolgen und ist verantwortlich für das spezifische Absorptionsmaximum bei 410 m $\mu$  (Silber, Porter).

Andere Steroide (z. B. Testosteron, Östradiol, Corticosteron - ebenso wie Aceton, Fruktose usw.) reagieren auch mit dem Phenylhydrazin-Schwefelsäure-Reagenz, die entstehenden Farbstoffe weisen aber ein anderes Absorptionsmaximum auf (Silber, Porter, 1954). Die meisten dieser Chromogene werden zudem durch Lösungsmittelverteilung im Verlaufe der Analyse vollständig eliminiert (Silber, Bush, 1955).

Die Ketogruppen an den Kohlenstoffatomen 3 und 11 (beim Cortison) beeinflussen zwar die Intensität der

Absorption, verursachen jedoch keine Verschiebung des Gipfels bei  $410\text{ m}\mu$  (Porter, Silber, 1954). Die Schwefelsäure bewirkt ebenfalls eine Intensivierung der Absorption, ihr genaues Eingreifen in den Reaktionsmechanismus ist jedoch noch ungeklärt.

## 2. Enzymatische Bestimmung von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma.

(Hübener, Lehmann, 1958; Hübener, Sahrholz, 1959; Hübener, Sahrholz, Schmidt-Thomé, Neseemann, Junk, 1959; Rick, Hübener, Pfeiffer, 1959).

### a) Lösungen und Reagenzien:

20 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase, 1 : 3- bis 1 : 10-fach verdünnte Kristallsuspension.

Cortisollösung,  $2 \cdot 10^{-4}$  molar. Da das Cortisol in so hoher Verdünnung nicht über längere Zeit stabil ist, mußte kurz vor der Analyse aus einer konzentrierteren Lösung eine Verdünnung hergestellt werden. Hierzu wurden 0,1 ml einer  $2 \cdot 10^{-2}$  molaren äthanolischen Cortisollösung (72,4 mg Cortisol gelöst in 10 ml Äthanol) in ein 10 ml Meßkölbchen pipettiert und dieses anschließend mit 0,1 prozentigem Titriplex-III-Wasser (pH etwa 7,3) aufgefüllt. 0,03 ml dieser Lösung enthielten 6 nM Cortisol, sie wurde für Nachstart und Kontrollwert verwandt.

Tris-Puffer, 0,05 molar, pH 7,3. 0,05 g Tris-Substanz wurden abgewogen und in ein 1 Liter-Becherglas mit Wasser überführt. Anschließend wurde noch 1 g Titriplex III zugewogen und die Lösung mit Wasser auf etwa 900 ml gebracht. Die Lösung wurde mit 25-prozentiger HCl P. A. auf  $\text{pH } 7,3 \pm 0,05$  eingestellt und in einem Meßkolben auf 1 l aufgefüllt.

DPNH,  $c = 5$ . DPNH-Boehringer wurde in einem Exsikkator im Kühlschrank aufbewahrt. Vor dem Einwiegen wurde es für kurze Zeit in einen Exsikkator bei Raumtemperatur gelegt, damit es in kaltem Zustand nicht zur Kondensation von Wasser an der Wand des Röhrchens kam. Anschließend wurden 5 mg des DPNH in ein 15 ml-Röhrchen eingewogen und 0,95 ml  $H_2O$  und 0,05 ml 0,2 molare Tris-Lösung (pH etwa 10) hinzugefügt.

Methylenchlorid (Merck Nr. 6050).

Äthanol (Merck Nr. 972).

Natriumsulfat, wasserfrei (Merck Nr. 6649).

Titriplex III (Merck Nr. 8418).

Cyclohexan (Merck Nr. 2832).

Glycerin (Merck Nr. 4094).

b) Analysengang:

Das Plasma wurde möglichst quantitativ in einen kleinen Meßzylinder überführt, und das Volumen protokolliert. Aus dem Meßzylinder wurde das Plasma in große Schliffzentrifugengläser gegossen, die vorher zweimal mit etwa 3 ml Methylenchlorid ausgespült worden waren. Anschließend wurden mit dem gleichen Meßzylinder 20 ml Methylenchlorid zugefügt.

In ein anderes großes Schliffzentrifugenglas wurden 10 ml Aqua bidestillata einpipettiert und ungefähr 0,1 g Titriplex III hinzugefügt. Anschließend wurden 0,03 ml der  $10^{-4}$  molaren Cortisolösung mit einem abgeflachten Glasstab in das Wasser eingeführt und danach 20 ml Methylenchlorid zugegeben (Kontrollwert).

Plasma- und Kontrollansatz wurden mit Kautexstopfen fest verschlossen, in ein Gestell eingesetzt und in einer Schüttelapparatur 30 Minuten durchmischt. Danach wurden die Gläser solange in Kohlensäureschnee gebracht, bis der Inhalt eingefroren war. Nach dem Auftauen wurde 15 Minuten bei 3 500 Umdrehungen pro

Minute zentrifugiert. Bei schlechter Trennung der Phasen wurde nochmals eingefroren. Dann wurde mit einer Rekordspritze und einer langen Kanüle ( $V_2A$ ) die obere Schicht durchstoßen, die Methylenchloridphase abgesaugt und in ein anderes Schliffzentrifugenglas überführt. Der Trichter war mit einem kleinen Wattestopfen und etwas wasserfreiem Natriumsulfat beschickt. Watte und Natriumsulfat im Trichter wurden zuvor zweimal mit ca. 5 ml Methylenchlorid durchspült.

Der wässrige Rückstand wurde jetzt in oben beschriebener Weise einer nochmaligen Extraktion mit 20 ml Methylenchlorid unterzogen, und die vereinigten Filtrate schließlich im Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft, wozu das Zentrifugenglas in ein Wasserbad von  $40^{\circ}C$  eingetaucht und durch einen glockenartigen Aufsatz der Methylenchloriddampf mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde.

Der Rückstand wurde dann in 0,8 ml Methylenchlorid gelöst und anschließend mit 2,0 ml Cyclohexan versetzt, und dieses Gemisch mittels eines Glastrichters in ein kleines Schliffzentrifugenglas überführt; anschließend wurde mit 1,5 ml Cyclohexan nachgespült.

Danach wurden 1,2 ml Glycerin langsam hinzupipettiert, die Schliffzentrifugengläser mit Kautextopfen fest verschlossen, in das Schüttelgestell gespannt, 1 Stunde geschüttelt und dann etwa 45 Minuten bei 4500 Umdrehungen pro Minute bei  $15^{\circ}C$  zentrifugiert. Die obere Phase der Glycerinverteilung wurde mit einer dünnen Polyvinylchlorid-Kapillare mittels einer Wasserstrahlpumpe quantitativ von der unteren (Glycerin-)Phase abgetrennt, wobei die dünne Emulsionsschicht zwischen beiden Phasen - soweit möglich - mit abgesaugt wurde. Nun wurden 0,9 ml der Glycerinphase unter Kontrolle eines Spiegels mit einer 1 ml-Stangenpipette abgesaugt, der Auslauf der Pipette mit Filterpapier abgewischt, und der Inhalt möglichst langsam in eine 3 cm-Spezialmeßküvette pipettiert. Anschließend wurden nacheinander 1,8 ml Tris-Puffer und 0,025 ml DPNH zugefügt,

und der Küvetteninhalt mit einem unten abgeflachten Glasstab solange durchmischt, bis keine Schlieren mehr erkennbar waren.

Jetzt wurde die Küvette mit Halter in das registrierende Spektralphotometer ZEISS, das mit einem Thermostaten auf 25° C gebracht war, eingesetzt und die Extinktion bei 334 m $\mu$  geschrieben. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampflampe (Heraeus Hanau). Das Gerät wurde folgendermaßen geschaltet: Vorschub 2, Empfindlichkeit 1, Dämpfung 2, Extinktion 0 . . . . 1.

Sobald der Schreiber konstante Extinktion schrieb, wurde ein Aliquot (meist 0,02 ml) des 20B-Enzyms mit einem unten abgeflachten Glasstäbchen in die Küvette verteilt. Die nun auftretende Extinktionsänderung war ein Maß für die in der Küvette vorhandene Menge Cortisol.

Nach Reaktionsablauf wurde mit 0,06 ml der Cortisolverdünnung nachgestartet.

Bei der Berechnung der Kurven mußte der "Schleich" graphisch berücksichtigt werden. Es wurde ausgemessen, welche Extinktionsänderung nach Zusatz des Enzyms aufgetreten war.

Die Berechnung wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\frac{E \cdot 10^9 \cdot \text{Glyc.-Ges.Menge} \cdot \text{Ges.Vol. d. Kuv.} \cdot 100}{6,5 \cdot 10^6 \cdot \text{eingesetzte Glyc.Menge} \cdot \text{Lichtw.} \cdot \text{ml Pl.}} =$$

$$= \text{nM Cortisol/100 ml Plasma}$$

E = Extinktionsänderung nach Enzymzugabe,  
10<sup>9</sup> = Umrechnungsfaktor, 1 Mol = 10<sup>9</sup> nM,  
6,5 · 10<sup>6</sup> = molare Extinktion des DPNH,  
Lichtweg = 6.

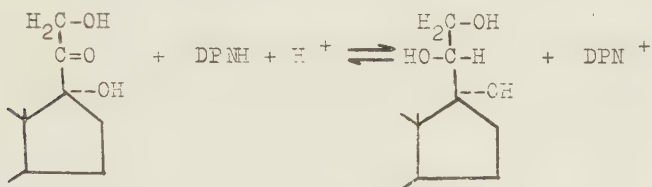
Vereinfachte Formel:

$$\frac{E \cdot 9,4 \cdot 10^3}{\text{ml Plasma}} = \text{nM Cortisol/100 ml Plasma}$$

$$\text{nM} \cdot 0,364 = \gamma \text{Cortisol/100 ml Plasma.}$$

c) Prinzip und Spezifität der enzymatischen Methode.

Die enzymatische Analyse von NNR-Steroiden beruht auf der 20-Ketoreduktion der NNR-Hormone mit Hilfe der aus *Streptomyces hydrogenans* gewonnenen 20 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase als Katalysator (H ü b e n e r, L e h m a n n, 1958; H ü b e n e r, S a h r h o l z, 1959; H ü b e n e r, S a h r h o l z, S c h m i d t - T h o m é, N e s e m a n n, J u n k, 1959):



Diese Reaktion verläuft unter den Bedingungen der Methode quantitativ zum 20 $\beta$ -Alkohol, wobei stöchiometrische Mengen DPNH zu DPN oxydiert werden. An der Extinktionsänderung bei 340 m $\mu$  läßt sich der Verlauf der Reaktion direkt verfolgen, da nur das DPNH bei dieser Wellenlänge absorbiert, nicht dagegen das DPN.

Die verschiedenen 20-Ketosteroide können nach der Geschwindigkeit ihrer Umsetzung identifiziert werden (z. B. wird Cortisol vom 20 $\beta$ -Enzym etwa zehnmal langsamer umgesetzt als Cortison).

Wenn zu Beginn der Reaktion mindestens doppelt soviel DPNH wie 20-Ketosteroid vorliegt, und die Ansätze auf pH 7,3 gepuffert sind, sollen mehr als 99 % des vorgelegten 20-Ketosteroids zum entsprechenden 20-Hydroxy-steroid reduziert werden.

Aceton, Dioxyaceton, Brenztraubensäure und Oxalessigsäure stören die Reaktion nicht.

### 3. Allgemeine Versuchsanordnung.

Bei einer Gruppe von 12 stoffwechselgesunden Versuchspersonen wurden 9<sup>00</sup> Uhr-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroidwerte im Plasma bestimmt.

Bei einer anderen Gruppe von 6 Stoffwechselgesunden und bei 9 Patienten mit pathologisch veränderter NNR-Funktion wurden insgesamt 19 ACTH-Belastungen zur Prüfung der NNR-Funktion bzw. -Funktionsreserve durchgeführt.

Alle ACTH-Belastungen fanden zwischen 9<sup>00</sup> und 17<sup>00</sup> Uhr statt. Ein besonderes Ernährungsregime wurde nicht eingehalten.

Vor-Beginn der Infusion wurden den Versuchspersonen 50 ml Blut aus der Vena cubitalis entnommen (9<sup>00</sup> Uhr-Ausgangswert); anschließend folgte eine Infusion von 25 I.E. ACTH in 500 ml physiologischer Kochsalzlösung. 4 und 8 Stunden nach Anlegen der Infusion wurden weitere Blutentnahmen von je 50 ml vorgenommen. Bei einigen Versuchspersonen nahmen wir die Blutentnahmen in kürzeren Intervallen vor, und zwar: vor der Infusion, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Anlegen der Infusion.

Das entnommene Blut wurde sofort mit Heparin ("Liquemin", Roche), 0,2 ml auf je 10 ml Blut, versetzt und innerhalb der nächsten 40 Minuten durch Zentrifugieren das Plasma gewonnen, das mit ca. 100 mg Titriplex III (auf je 10 ml Plasma) vermischt und bis zur Analyse bei ca. -18<sup>0</sup> C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt wurde.

Die Analyse erfolgte in der Regel 3 bis 14 Tage nach der ACTH-Belastung.

Für jede Analyse wurden bei kolorimetrischer Bestimmung 12 ml, bei enzymatischer 5 bis 10 ml Plasma benötigt. Das Plasma wurde entsprechend geteilt. Die kolorimetrische Bestimmung wurde im Hormonlabor der I. Medizinischen Universitätsklinik, Frankfurt am Main, vorgenommen, die enzymatische erfolgte am Institut für Vegetative Physiologie, Frankfurt am Main.

Wenn es technisch möglich war, und der Zustand der Patienten die wiederholten Blutentnahmen zuließ, wurden ACTH-Belastungen und Blutentnahmen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vorgenommen.

C. E R G E B N I S S E

1. Plasma-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei normaler NNR-Funktion vor und unter ACTH.

a) 9<sup>00</sup> Uhr-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei Stoffwechselgesunden.

Von 12 stoffwechselgesunden Versuchspersonen weiblichen und männlichen Geschlechts im Alter zwischen 18 und 47 Jahren wurden kolorimetrisch 9<sup>00</sup> Uhr-Plasmawerte bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt (Die Tabelle und die Abbildungen befinden sich am Ende der Arbeit).

Die mit dem Silber-Bush-Verfahren gewonnenen Werte lagen zwischen 10 und 32,8%, die enzymatisch bestimmten zwischen 7 und 32,2%. Die Mittelwerte von 18,0 beziehungsweise 17,8% stimmten fast genau überein. Für die mittlere quadratische Streuung ergab sich bei enzymatischer Bestimmung mit 6,4% gegenüber kolorimetrischer Bestimmung mit 5,8% ein um nur 0,6% abweichender Wert.

b) Verhalten der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei Stoffwechselgesunden unter ACTH.

Bei 6 Stoffwechselgesunden wurden ACTH-Belastungen in Form der 8-stündigen Infusion von 25 I.E. ACTH durchgeführt. Abb. 1 zeigt das Ergebnis, links als Mittelwertskurve bei kolorimetrischer, rechts bei enzymatischer Bestimmung der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma.

Von 9<sup>00</sup> Uhr-Ausgangswerten von  $18,0 \pm 4,8\%$  kolorimetrisch und  $22,0 \pm 9,5\%$  enzymatisch stiegen die 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma nach 4 Stunden auf  $40,2 \pm 3,2\%$  bei kolorimetrischer und

auf  $44,1 \pm 8,5\%$  bei enzymatischer Bestimmung an. 8 Stunden nach Infusionsbeginn wurden Werte von  $51,2 \pm 6,0\%$  und  $50,5 \pm 12,8\%$  gemessen. Die aus jeweils 6 Werten gebildeten Mittelwerte zeigten also eine gute Übereinstimmung, die mittlere quadratische Streuung der enzymatisch bestimmten Werte war größer.

## 2. Plasma-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei NNR-Unterfunktion vor und unter ACTH.

### a) bei primärer NNR-Unterfunktion (Morbus Addison).

Bei 4 Patienten (3 ♀ und 1 ♂) mit primärer NNR-Unterfunktion wurde die Funktionsreserve der NNR mittels ACTH-Stimulierung mit beiden Methoden untersucht. Alle 4 Patienten zeigten klinisch das typische Bild der NNR-Unterfunktion: deutliche Haut- und Schleimhautpigmentierungen, Störungen im Mineralhaushalt, Hypotonie, Gewichtsabnahme und Adynamie.

Die Ergebnisse der ACTH-Belastungen sind in Abb. 2 wiederum als Mittelwertskurven graphisch dargestellt. Die kolorimetrisch bestimmten 9<sup>00</sup> Uhr-Ausgangswerte der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma lagen bei diesen 4 Patienten bei  $14,2 \pm 4,1\%$ , die enzymatisch bestimmten bei  $16,3 \pm 2,0\%$ .

4 Stunden nach Infusionsbeginn wurden bei kolorimetrischer Bestimmung Werte von  $14,2 \pm 4,1\%$ , bei enzymatischer Werte von  $23,8 \pm 11,2\%$  gemessen. Auch die 8-Stundenwerte der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma lagen mit  $16,9 \pm 4,1\%$  und  $21,8 \pm 10,0\%$  deutlich erniedrigt im pathologischen Bereich. Während also beide Methoden nahezu gleiche Ausgangswerte lieferten, zeigten die 4- und 8-Stundenwerte bei enzymatischer Bestimmung eine erheblich größere mittlere quadratische Streuung.

Nur bei einem der 4 Patienten mit primärer NNR-Insuffizienz lag der 9<sup>00</sup> Uhr-Ausgangswert der Plasma-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei kolorimetrischer Bestimmung mit 8,0% (enzymatisch 14,3%) eindeutig unterhalb des Streubereiches der 9<sup>00</sup>-Uhrwerte der Versuchspersonen mit normaler NNR-Funktion.

Eine besonders charakteristische Reaktion auf ACTH bei primärer NNR-Insuffizienz ist in Abb. 3 gesondert wiedergegeben. Es handelte sich um einen 31-jährigen Patienten mit einem Morbus Addison auf dem Boden einer NNR-Tuberkulose.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, kam es in diesem Fall zu keinem über die Schwankungsbreite der verwandten Methoden hinausgehenden Anstieg. (Der 8-Stundenwert konnte nur kolorimetrisch bestimmt werden!).

#### b) bei sekundärer NNR-Unterfunktion (Sheehan-Syndrom).

Bei einem 47 Jahre alten Patienten mit sekundärer NNR-Insuffizienz wurden vor der operativen Entfernung eines chromophoben Adenoms des Hypophysenvorderlappens Hormonanalysen im Blut durchgeführt.

Neben dem Bild einer sekundären NNR-Insuffizienz bot der Patient das Bild einer sekundären Schilddrüsen- und Gonadeninsuffizienz. Durch den Ausfall des melanocytenstimulierenden Hormons (MSH) wurde die bekannte alabasterne Blässe der Haut verursacht. Der Mineralhaushalt war nicht gestört.

Bei der enzymatischen Analyse kam es infolge von Cortisolverunreinigungen der Proben zu Fehlbestimmungen. In Abb. 4 und 5 sind daher nur die kolorimetrisch bestimmten 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide eingetragen.

Mit 8,1% lag der 9<sup>00</sup> Uhr-Ausgangswert der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma bei diesem Patienten mit sekundärer NNR-Unterfunktion deutlich unterhalb des Normbereiches. Wie der Verlauf der

Kurve zeigt, war die Nebennierenrinde außerdem nicht in der Lage auf eine Stimulierung mit exogenem ACTH mit einer vermehrten Ausschüttung von Cortisol zu antworten.

Auch nach 8-tägiger Substitution des Patienten mit 40 I.E. ACTH intramuskulär (die ACTH Medikation wurde 1 Tag vor der ACTH-Belastung abgesetzt!) zeigte sich kein eindeutiger Anstieg der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma bei der ACTH-Belastung (Abb. 5).

### 3. Plasma-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide bei - Überfunktion vor und unter ACTH.

#### a) bei Cushing-Syndrom.

Zwei Patienten gelangten zur Untersuchung, die klinisch unterschiedliche Verlaufsformen eines Cushing-Syndroms boten:

Fall 1: W., H., ♂, 26 Jahre.

Es handelte sich hier um einen 26-jährigen Mann mit der vollen Symptomatologie eines progredienten Cushing-Syndroms, der charakteristischen Änderung der Fettverteilung (Vollmondgesicht, Büffelnacken), Hypertonie, Hyperglykämie, Polyglobulie, Osteoporose der Wirbelsäule, verminderter Libido und Potenz, breiten blauen Striae am Abdomen und Akne vulgaris. Dieses typische Cushing-Bild hatte sich in weniger als einem Jahr herausgebildet.

Das Ergebnis der ACTH-Belastung in Form der 8-stündigen Infusion von 25 I.E. ACTH zeigt Abb. 6.

Die 9<sup>00</sup> Uhr-Ausgangswerte der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide waren mit 25,0 und 32,3  $\mu$ % erhöht, unter ACTH kam es zu einer überschießenden Ausschüttung mit einem Anstieg auf 148,4  $\mu$ % bei kolorimetrischer Bestimmung 8 Stunden nach Infusionsbeginn. 6 Stunden nach Infusionsbeginn wurde auch mit der enzymatischen Methode ein

stark erhöhter Wert von 88,5% gefunden. (Infolge technischer Schwierigkeiten standen keine ausreichenden Plasmamengen zur Verfügung, so daß lediglich die Ausgangswerte parallel bestimmt werden konnten. Trotzdem kommt der übereinstimmende Verlauf beider Kurven in Abb. 6 zum Ausdruck.)

Bei diesem Patienten wurde einige Monate später auf Grund der Hormonanalysen und der Tatsache, daß eine Röntgenbestrahlung der Hypophyse das klinische Bild in keiner Weise beeinflußt hatte, eine Totalexstirpation der einen und eine Zweidrittel-Resektion der anderen Nebenniere vorgenommen. Die histologische Untersuchung zeigte eine beidseitige Hyperplasie der Nebennierenrinde.

Fall 2: K., H., ♀, 34 Jahre.

Hier bestand neben einem schweren Diabetes ein Cushing-Syndrom mit folgender Symptomatologie: Rotes Vollmondgesicht, Stammfettsucht, Hypertonie, Polyglobulie, mäßiger Hirsutismus, breite blaurote Striae am Abdomen und an den Oberarmen sowie Amenorrhoe. Eine Progredienz des Krankheitsbildes, das praktisch seit der Pubertät bestand, war jedoch - im Gegensatz zum vorigen Fall - nicht festzustellen.

Da die Patientin sich längere Zeit in klinischer Beobachtung befand, konnten in gewissen Zeitabständen mehrere ACTH-Belastungen durchgeführt werden.

Abb. 7 zeigt den Plasmabefund vom 24. 3. 1959.

Der kolorimetrisch bestimmte Ausgangswert lag mit 17,9% vollkommen im Normbereich, während die enzymatische Bestimmung einen etwas erhöhten Plasmacortisolwert von 25,8% lieferte. Erst unter ACTH kommt jedoch der Überfunktionszustand der NNR in 8-Stundenwerten von 71,8% und 96,3% klar zum Ausdruck.

Durch eine weitere ACTH-Belastung am 20. 10. 1959, deren Ergebnis in Abb. 8 graphisch dargestellt ist, wurde der Befund vom 24. 3. 1959 bestätigt. Von Ausgangswerten von 19,4% und 25,1% um 9<sup>00</sup> kam es nach Infusion von 25 I.E. ACTH über 8 Stunden zu einem

Anstieg auf 72,1% bei kolorimetrischer Bestimmung. Enzymatisch wurde bereits 4 Stunden nach Infusionsbeginn ein Wert von 69,9% gemessen.

Da eine Röntgenbestrahlung der Hypophyse das klinische Bild (Vollmondgesicht, Stammfettsucht, Hypertonie usw.) in keiner Weise beeinflusste, und die Reaktion auf exogenes ACTH weiterhin pathologisch erhöht blieb, wurde eine einseitige Nebennieren-Extirpation und eine 2/3-Resektion der anderen Nebenniere vorgeschlagen. 14 Tage nach der Operation kam die Patientin an multiplen Lungenembolien ad exitum. Die histologische Untersuchung ergab eine kleinknotige Hyperplasie beider Nebennierenrinden.

b) bei adrenogenitalem Syndrom.

Bei einer Patientin mit angeborenem adrenogenitalem Syndrom wurden nach vorübergehendem Absetzen der Decadronbehandlung (1,5 mg pro die per os) Hormonanalysen vorgenommen.

Das klinische Bild, das die Patientin bot, war außerordentlich typisch: der Wuchs war klein, der Habitus ausgesprochen männlich, sie zeigte ausgeprägte Körper- und Bartbehaarung, ein stark hervortretendes Muskelprofil, eine mangelhafte Brusterwicklung und eine starke Vergrößerung der Klitoris. Der Uterus war klein.

Es wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen ACTH-Belastungen durchgeführt, deren Ergebnis in Abb. 9 und Abb. 10 dargestellt ist.

Die Ausgangswerte von 15,8% bei kolorimetrischer und von 21,2% bei enzymatischer Bestimmung am 1. ACTH-Tag lagen durchaus im Normbereich. Der für den Stoffwechselgesunden charakteristische Anstieg der 17-OH-Corticosteroide nach Stimulierung der NNR mittels ACTH blieb jedoch aus. Bei enzymatischer Bestimmung lagen 4- und 8-Stundenwert sogar um 3,0%

beziehungsweise 12,2% unter dem Ausgangswert von 21,2%.

Am 2. ACTH-Tag war der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroid-Spiegel mit 9,0% bei kolorimetrischer und 12,4% bei enzymatischer Bestimmung bedeutend niedriger. Unter ACTH kam es hier ebenfalls zu keinem über die methodische Schwankungsbreite hinausgehenden Anstieg. Dieses Verhalten erklärt sich dadurch, daß beim adrenogenitalen Syndrom bei Stimulierung der NNR durch exogenes ACTH die Ausschüttung von Androgenen ganz im Vordergrund steht, während die NNR nicht oder nur in stark vermindertem Maße in der Lage ist, vermehrt Cortisol auszuschütten.

#### c) bei NNR-Carcinom.

Bei einer 45-jährigen Patientin mit NNR-Carcinom - der Befund war zuvor histologisch gesichert worden - erhielten wir bei der ACTH-Belastung folgendes Ergebnis (Abb. 11):

Die enzymatische Bestimmung ergab einen vollkommen normalen Anstieg der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma nach ACTH-Stimulierung von 16,8% auf 41,3% nach 4 Stunden. Nach 8 Stunden wurde ein Wert von 39,9% gemessen. Die kolorimetrische Methode lieferte parallel dazu höher liegende Werte von 22,2%, 60,0% und 54,4%.

Dieser Unterschied ist auffällig, wenn auch nicht signifikant. Es ist wahrscheinlich, daß hier kolorimetrisch Substanzen mitreagierten, die bei der enzymatischen Bestimmung nicht erfaßt wurden. Möglicherweise handelte es sich hier um ein zum Teil Androgene produzierendes Carcinom.

## D. D I S K U S S I O N

Es ist zu einem großen Teil Verdienst der biochemischen Forschung, daß Diagnose und Therapie innersekretorischer Krankheiten in den letzten Jahren so außerordentliche Fortschritte gemacht haben. Sie hat nicht nur neue Stoffe zur Therapie endokriner Erkrankungen, sondern auch neue Methoden zur quantitativen Bestimmung von Hormonen und deren Metaboliten in den Körperflüssigkeiten entwickelt.

Die Analyse von NNR-Hormonen im Blutplasma hat für spezielle klinische und biologische Fragestellungen eine große Bedeutung gewonnen. Als ideal erwies sich die Bestimmung der Corticosteroide im Blut vor, während und nach Stimulierung der NNR durch exogenes ACTH, da es nur so gelingt, Einblicke in den Funktionszustand zu bekommen und die Funktionsreserve der endokrinen Drüse zu erfassen (B l i s s, N e l s o n, S a m u e l s, E i k - N e s, S a n d b e r g, T y l e r, M i g e o n, P f e i f f e r).

Die heute gebräuchlichsten kolorimetrischen Methoden zur Cortisolbestimmung im Plasma (P o r t e r, S i l b e r 1950; S i l b e r, P o r t e r 1954; S i l b e r, B u s h 1956) haben allerdings den Nachteil - wie die meisten kolorimetrischen Methoden - nicht absolut spezifisch zu sein. Deshalb wurden unter anderem verschiedene Verfahren zur Vorreinigung des Plasmas empfohlen (N e l s o n, S a m u e l s; B a y l i s s, S t e i n b e c k; B o n g i o v a n n i; B i e r i c h). Sie alle haben natürlich die klinische Routine wiederum umständlicher gestaltet.

Im Hormonlabor der I. Medizinischen Universitätsklinik, Frankfurt/Main, hatte sich ein etwas modifiziertes Silber-Bush-Verfahren (S i l b e r, B u s h 1956) zur Bestimmung der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide gut bewährt.

Nach der Entwicklung einer enzymatischen Bestimmungsmethode für Cortisol (H ü b e n e r, L e h m a n n 1958; H ü b e n e r, S a h r h o l z 1959) lag es nahe, diese neue Methode mit der bisher verwandten kolorimetrischen zu vergleichen und auf ihre Brauchbarkeit für den klinischen Routinebetrieb zu untersuchen.

Diese vergleichsweise Bestimmung von Cortisol im Plasma mit dem modifizierten Silber-Bush-Verfahren und der neuen enzymatischen Methode wurde an Versuchspersonen mit normaler und pathologisch veränderter NNR-Funktion meist in Form der ACTH-Belastung durchgeführt.

Die Bestimmung der 9<sup>00</sup>-Uhr-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroidwerte im Plasma bei 12 Stoffwechselgesunden mit beiden Verfahren lieferte identische Ergebnisse. Extremwerte (kolorimetrisch: 10,0 - 32,8%, enzymatisch: 7,0 - 32,2%), Mittelwerte (kolorimetrisch: 18,0%, enzymatisch: 17,8%) und mittlere quadratische Abweichung (kolorimetrisch:  $\sigma = 5,8\%$ , enzymatisch:  $\sigma = 6,4\%$ ) in unserem Untersuchungsmaterial stimmten außerdem mit den von W a l l a c e und den von B i e r i c h veröffentlichten Werten sehr gut überein. (Beide Autoren arbeiteten mit dem Porter-Silber-Verfahren von 1954).

Bei 6 Stoffwechselgesunden unter ACTH ließ sich übereinstimmend ein sofort nach Infusionsbeginn einsetzender Anstieg der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide von  $18,0 \pm 4,8\%$  kolorimetrisch und  $22,0 \pm 9,5\%$  enzymatisch vor Anlegen der Infusion auf  $51,2 \pm 6,0\%$  und  $50,5 \pm 12,8\%$  8 Stunden nach Infusionsbeginn feststellen. Die Streuung der enzymatisch bestimmten Werte war etwas größer als die der kolorimetrisch bestimmten.

Kolorimetrische und enzymatische Bestimmung der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma bei 4 Patienten mit Morbus Addison lieferten vergleichbare

Werte. Die 9<sup>00</sup> Uhr-Ausgangswerte stimmten sehr gut überein, während die Mittelwerte der enzymatisch bestimmten 4- und 8-Stundenwerte unter Aktivierung der NNR mit ACTH mit  $23,8 \pm 11,2\%$  und  $21,8 \pm 10,0\%$  um etwa 10 beziehungsweise  $5\%$  über den entsprechenden kolorimetrischen Werten lagen und auch eine größere mittlere quadratische Streuung aufwiesen. Übereinstimmend wurden mit beiden Methoden bei 3 der 4 Patienten mit primärer NNR-Unterfunktion 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroid-Ausgangswerte gemessen, die im beziehungsweise an der unteren Grenze des Normbereichs lagen. Wir sahen, daß in solchen Fällen der ACTH-Belastung eine besondere Bedeutung zukommt, da erst sie durch Erfassung der eigentlichen Funktionsreserve des Organs - im Gegensatz zur einfachen Plasmabestimmung - eine NNR-Insuffizienz mit Sicherheit diagnostizieren läßt.

Bei einem Fall von klinisch voll ausgeprägtem Sheehan-Syndrom fanden wir - kolorimetrisch - mit einem Ausgangswert von  $8,1\%$  deutlich erniedrigte 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroidwerte im Plasma. Auf ACTH erfolgte keine meßbare Reaktion der NNR. Auch nach 8-tägiger Substitution mit Depot-ACTH hatte eine erneute Stimulierung der NNR mittels der ACTH-Infusion keine gesteigerte Cortisolausschüttung zur Folge, das heißt, die NNR befand sich noch im Zustand der Insuffizienz.

Bei den NNR-Überfunktionszuständen kamen wir bei 2 Patienten mit Cushing-Syndrom mit der kolorimetrischen und der enzymatischen Untersuchungsmethode bei mehreren ACTH-Belastungen zu übereinstimmenden oder vergleichbaren Ergebnissen. Bei beiden Patienten kam es von zum Teil im Normalbereich liegenden Ausgangswerten unter ACTH zu einer überschießenden Ausschüttung von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden, wobei in dem einen Fall ein Wert von fast  $150\%$  gemessen wurde.

Bei einem Fall von angeborenem adrenogenitalen Syndrom

bei Hyperplasie der NNR wurde - ebenfalls übereinstimmend - an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bei Ausgangswerten von 15,8% kolorimetrisch und 21,2% enzymatisch kein Anstieg auf ACTH festgestellt. Am zweiten Belastungstag lagen die Ausgangswerte mit 9,0% und 12,4% - wahrscheinlich Zeichen der Erschöpfung der NNR - noch niedriger als am 1. ACTH-Tag. Diese Ergebnisse entsprechen durchaus den Vorstellungen, die man heute über die Pathogenese des angeborenen AGS hat (B o n - g i o v a n n i, E b e r l e i n 1956): Beim AGS liegt eine Störung im Enzymsystem der NNR vor, die einen Cortisolmangel zur Folge hat. Dadurch kommt es zu einem Wegfall der ACTH-Bremmung, der schließlich zu einer Hyperplasie führen muß. Beim AGS produziert nun die hyperplasierte NNR aus dem zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterial vermehrt Androgene, die bei der Frau zur Virilisierung führen. Bei Stimulierung der NNR durch exogenes ACTH steht der Anstieg der Androgene daher ganz im Vordergrund, während die NNR nicht oder nur in stark vermindertem Maße in der Lage ist, vermehrt Cortisol auszuschütten.

Ein Fall von NNR-Carcinom wurde untersucht, bei dem die 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma eine normale Reaktion auf exogenes ACTH erkennen ließen. Die kolorimetrisch gewonnenen Werte lagen mit 22,2%, 60,0% und 54,4% um 5,4%, 18,7% und 13,1% über den entsprechenden enzymatischen. Ein auffälliger, wenn auch nicht signifikanter Unterschied. Möglicherweise hat es sich hier um ein zum Teil Androgene produzierendes Carcinom gehandelt, wobei kolorimetrisch Steroide mitreagierten, die bei enzymatischer Bestimmung nicht miterfaßt wurden. Die im Normbereich liegenden Ausgangswerte, und das Ansprechen auf ACTH machen es jedoch wahrscheinlich, daß ein großer Teil des NNR-Gewebes funktionstüchtig und der über kindskopfgröße Tumor im wesentlichen hormonell inaktiv gewesen ist. Kontrolluntersuchungen waren leider nicht möglich.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß mit dem kolorimetrischen Silber-Bush-Verfahren (1956) und der neuen enzymatischen Bestimmungsmethode für Cortisol im Plasma (H ü b e n e r, L e h m a n n 1958; H ü b e n e r, S a h r h o l z 1959) bei Untersuchungen an Versuchspersonen mit normaler und pathologisch veränderter NNR-Funktion identische, zumindest jedoch vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden.

Eine größere Genauigkeit des neuen enzymatischen Verfahrens ist nach unseren Untersuchungen nicht gegeben: die enzymatisch bestimmten Werte lagen oft über den kolorimetrisch bestimmten und wiesen bei Mehrfachbestimmungen eine zum Teil deutlich größere mittlere quadratische Streuung auf.

Nur bei einem Fall von NNR-Carcinom lagen die kolorimetrischen Werte deutlich über den enzymatischen. Hierbei könnte es sich um eine größere Spezifität des enzymatischen Verfahrens bei dem möglicherweise auch Androgene produzierenden Carcinom gehandelt haben.

Was die technische Durchführbarkeit anbetrifft, erscheint uns das Silber-Bush-Verfahren als das für eine routinemäßige Anwendung geeignetere Verfahren. Zwar ist das Extraktionsverfahren - extrahiert wird in beiden Fällen mit Methylenchlorid - bei der enzymatischen Bestimmung einfacher, da die für gute Ergebnisse bei kolorimetrischer Bestimmung der 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma unerläßliche Vorreinigung der Plasmaproben mit Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther wegfallen kann.

Auf der anderen Seite ist das enzymatische Verfahren für die Praxis überhaupt nur diskutabel unter Verwendung eines sehr kostspieligen selbstregistrierenden Photometers, wogegen ein nicht zu unterschätzender Vorteil für die routinemäßige Anwendung des Silber-Bush-Verfahrens darin besteht, daß außer Spezialküvetten und einem normalen Photometer - das sich heute in fast jedem Labor findet - keinerlei Spezialapparatur benö-

tigt wird.

Auf Grund dieser Tatsachen und im Hinblick auf unsere Ergebnisse halten wir das modifizierte Silber-Bush-Verfahren im klinischen Routinebetrieb nach wie vor für die Methode der Wahl.

Ohne Zweifel stellt jedoch das neue, noch viele andere Möglichkeiten bietende enzymatische Verfahren eine interessante Bereicherung der Methoden zur Bestimmung von Corticosteroiden in den Körperflüssigkeiten dar.

## ZUSAMMENFASSUNG

In Form von Parallelanalysen mit einer kolorimetrischen (Silber, Bush, 1956) und einer neuen enzymatischen Methode (Hübener, 1959) - die ausführlich besprochen werden - wurden die 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma von Versuchspersonen mit normaler und pathologisch veränderter NR-Funktion untersucht.

Bei 12 Stoffwechselgesunden wurden die 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma um 9<sup>00</sup> Uhr bestimmt. Bei weiteren 6 Stoffwechselgesunden, 4 Patienten mit primärer, 1 mit sekundärer NR-Unterfunktion, 2 Patienten mit Cushing-Syndrom, 1 Patientin mit angeborenem adrenogenitalem Syndrom (AGS) und 1 Patientin mit NR-Carcinom wurden insgesamt 18 ACTH-Belastungen (25 I.E. ACTH als Infusion über 8 Stunden) durchgeführt, wobei vor, während und nach der Infusion die 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroide im Plasma kolorimetrisch und enzymatisch bestimmt wurden.

Im wesentlichen wurden dabei mit beiden Verfahren identische, zumindest jedoch vergleichbare Ergebnisse erzielt. Eine größere Genauigkeit der neuen enzymatischen Methode zur Bestimmung von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma ist nach unseren Untersuchungen nicht gegeben.

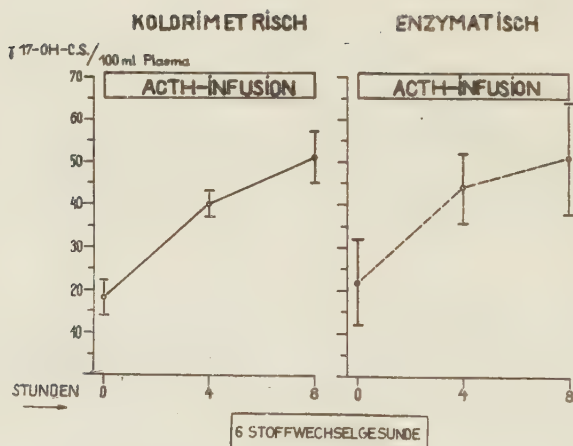
In Anbetracht dieses Ergebnisses und der weniger aufwendigen Technik erscheint uns das modifizierte Silber-Bush-Verfahren im klinischen Routinebetrieb nach wie vor als die Methode der Wahl.

A B B I L D U N G E N

T a b e l l e 1

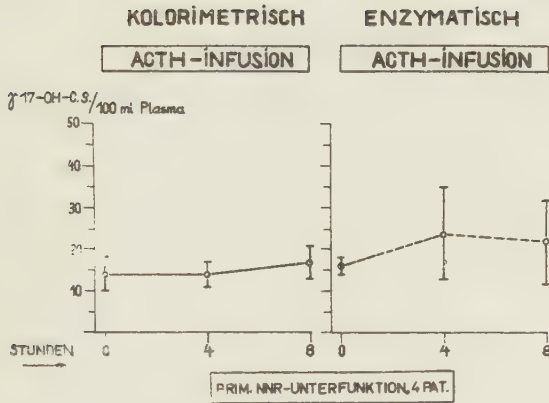
| METHODE        | ANZAHL DER<br>ANALYSEN | EXTREM-<br>WERTE | m     | $\sigma$ | ( $m \pm \sigma$ ) |
|----------------|------------------------|------------------|-------|----------|--------------------|
| KOLORIMETRISCH | 12                     | 10-32,8%         | 18,0% | 5,8%     | 12,2 - 23,8%       |
| ENZYMATISCH    |                        | 7-32,2%          | 17,8% | 6,4%     | 11,4 - 24,2%       |

Extremwerte, Mittelwerte, mittlere quadratische Streuung und Vertrauensgrenzen - Gegenüberstellung kolorimetrisch und enzymatisch bestimmter 9.00 Uhr-17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroidwerte im Plasma bei 12 Stoffwechselgesunden.

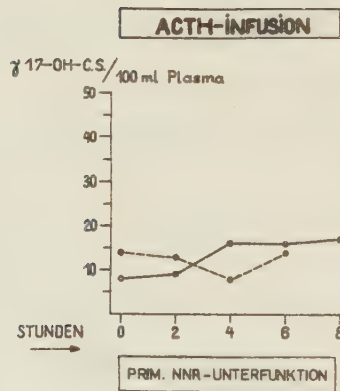


A b b. 1: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden bei 6 Stoffwechselgesunden unter ACTH Infusion (25 I.E.).

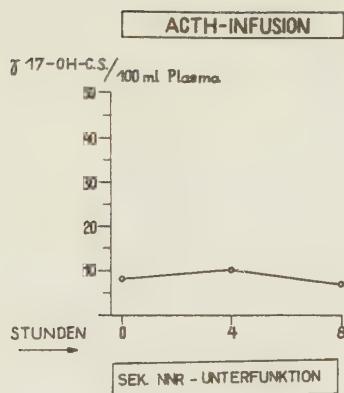
Mittelwerte und mittlere quadratische Streuung bei kolorimetrischer und enzymatischer Bestimmung.



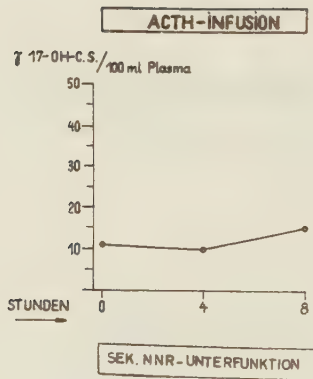
A b b. 2: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma bei 4 Patienten mit Morbus Addison unter ACTH-Infusion (25 I.E.). Mittelwerte und mittlere quadratische Streuung bei kolorimetrischer und enzymatischer Bestimmung.



A b b. 3: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma bei einem Addison-Patienten unter ACTH-Infusion (25 I.E.) bei kolorimetrischer — und bei enzymatischer --- Bestimmung.



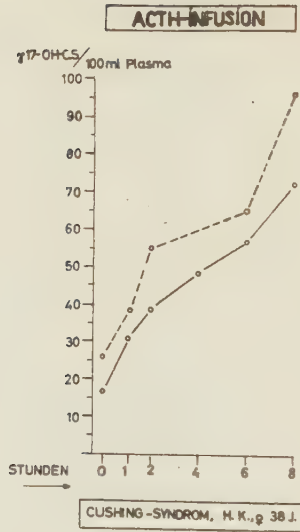
A b b. 4: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma bei einem Patienten mit sekundärer NNR-Unterfunktion unter ACTH-Infusion (25 I.E.) bei kolorimetrischer Bestimmung.



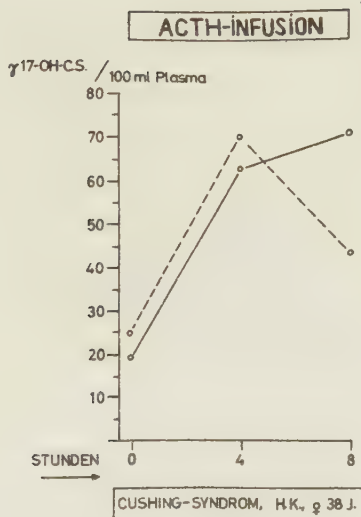
A b b. 5: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma bei demselben Patienten mit sekundärer NNR-Unterfunktion wie in A b b. 4 unter ACTH-Infusion (25 I.E.) nach 8-tägiger ACTH-Substitutionsbehandlung bei kolorimetrischer Bestimmung.



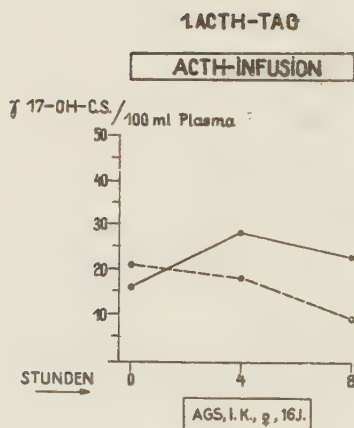
A b b. 6: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma bei einem Patienten mit Cushing-Syndrom unter ACTH-Infusion (25 I.E.) bei kolorimetrischer — und enzymatischer --- Bestimmung.



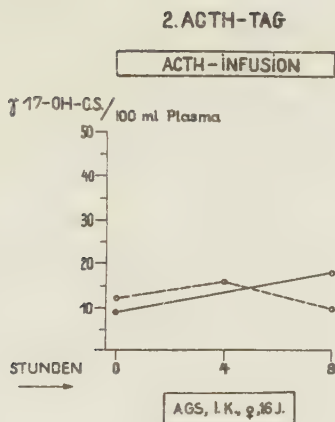
A b b. 7: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma bei einer Patientin mit Cushing-Syndrom unter ACTH-Infusion (25 I.E.) bei kolorimetrischer — und enzymatischer --- Bestimmung.



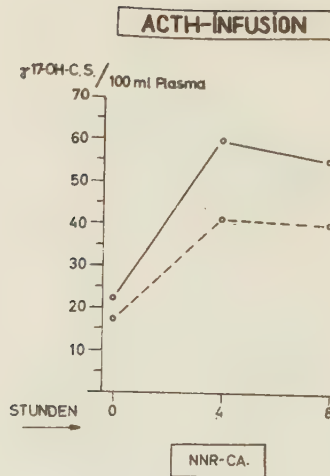
A b b. 8: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma bei derselben Patientin wie in A b b. 7 unter ACTH-Infusion (25 I.E.) 7 Monate später. Kolorimetrische — und enzymatische --- Bestimmung.



A b b. 9: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Keto-steroiden im Plasma bei einer Patientin mit angeborenem AGS unter ACTH-Infusion (25 I.E.) bei kolorimetrischer — und enzymatischer --- Bestimmung. 1. ACTH-Tag.



A b b. 10: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma bei derselben Patientin mit angeborenem AGS wie in A b b. 9 unter ACT-Infusion (25 I.E.) bei kolorimetrischer — und bei enzymatischer --- Bestimmung. 2. ACTH-Tag.



A b b. 11: Verhalten von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im Plasma bei einer Patientin mit NNR-Carcinom unter ACTH-Infusion (25 I.E.) bei kolorimetrischer — und bei enzymatischer --- Bestimmung.

L I T E R A T U R

- Bayliss, R., I., S., Steinbeck, A., W.: A modified method for estimating 17-hydroxycorticosteroids in plasma, *Biochem. J.* 54: 523, 1953.
- Bierich, J., R.: Methoden zur Bestimmung der freien Corticosteroide im Plasma, *Endokrinologie* 37: 25, 1959.
- Bliss, E., L., Nelson, D., H., Samuels, L., T.: Effect of intravenous ACTH on blood levels of 17-hydroxycorticoids and circulating leukocytes, *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* 14: 423, 1954.
- Bongiovanni, A., M., Eberlein, W., R.: Congenital adrenal hyperplasia: An inborn error of metabolism, *Helv. paediat. Acta* 11: 105, 1956.
- Bongiovanni, A., M. in: Standard methods of clinical chemistry II., S. 61, New York: Acad. Press. Inc., 1958.
- Eik-Nes, K., Sandberg, A., A., Nelson, D., H., Tyler, F., H., Samuels, L., T.: Changes in plasma levels of 17-hydroxycorticosteroids during the intravenous administration of ACTH. I. A test of adrenocortical capacity in the human, *J. Clin. Invest.* 33: 1502, 1954.
- Eik-Nes, K., Sandberg, A., A., Migeon, C., H., Tyler, F., H., Samuels, L., T.: Changes in plasma levels of 17-hydroxycorticosteroids during the intravenous administration of ACTH. II. Response under various clinical conditions, *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* 15: 13, 1955.
- Hübener, H., J., Lehmann, G., O.: Die enzymatische 20-keto-Reduktion durch Extrakte aus *Streptomyces hydrogenans*, *Hoppe-Seylers physiol. Chem.* 313: 124, 1958.
- Hübener, H., J., Sahrholz, F., G.: Über eine enzymatische Analyse von Nebennierenrinden-Hormonen im Blutplasma, *Die Naturwissenschaften* 46: 112, 1959.
- Hübener, H., J., Sahrholz, F., G., Schmidt-Thomé, J., Nesemann, G., Junk, R.: 20 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase, ein neues kristallines Enzym, *Biochem. Biophys. Acta* 35: 270, 1959.
- Nelson, D., H., Samuels, L., T.: A method for the determination of 17-hydroxy-corticosteroids in blood: 17-hydroxycorticosterone in the peripher circulation, *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* 12: 519, 1952.
- Peterson, R., E., Wyngaarden, J., B., Guerra, S., L., Brodie, B., B., Bunim, J., J.: The physiological disposition and metabolic fate of hydrocortisone in man, *J. Clin. Invest.* 34: 1779, 1955.

- Pfeiffer, E.,F.: Die Bedeutung der Hormonanalysen für Diagnose und Therapie, Vortrag, Deutsche Therapie-woche Karlsruhe, 1959.
- Porter, C.,C., Silber, R.,H.: A quantitativ color reaction for cortisone and relates 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids, J. Biol. Chem. 185: 201, 1950.
- Rick, W., Hübener, H.,J., Pfeiffer, E.,F.: Clinical applications of a new method for the enzymic determination of plasma corticosteroids, Vortrag, Meeting on Endocrinology, Edinburgh, 1959.
- Silber, R.,H., Porter, C.,C.: The determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma, J. Biol. Chem. 210: 923, 1954.
- Silber, R.,H., Bush, R.,D.: The specificity of the reaction of phenylhydrazine with 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids, J. Clin. Endocrinol. & Metab. 15: 505, 1955.
- Silber, R.,H., Bush, R.,D.: An improved procedure for the determination of hydrocortisone in human plasma, J. Clin. Endocrinol. & Metab. 16: 1333, 1956.
- Wallace, E.,Z., Christy, N.,P., Jailer, J.,W.: The effect of intravenously-administered ACTH on plasma 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in normal individuals and in patients with disorders of the adrenal cortex, J. Clin. Invest. 34: 899, 1955.

## LEBENS LAUF

Am 7. November 1935 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Fritz Kollatz und seiner Ehefrau Margarete geb. Kuhr in Königsberg (Pr.) geboren. Ich besuchte die Volksschule in Königsberg. Nach der durch die Vertreibung bedingten Unterbrechung setzte ich meine Schulausbildung am Prälat-Diehl-Realgymnasium in Groß-Gerau fort, wo ich 1956 die Reifeprüfung bestand.

Vom Sommersemester 1956 an studierte ich Medizin in Frankfurt/Main. Hier legte ich 1962 die ärztliche Prüfung ab. Im Februar 1964 wurde mir die Bestallung als Arzt erteilt.

Seit März 1964 bin ich als Assistenzarzt am Pathologisch-Bakteriologischen Institut der Städtischen Krankenhäusern in Darmstadt tätig.

Eckhard Kollatz

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer  
=====

Prof. Dr. med., Dr. med. dent., Dr. phil. Walter  
Artelt, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Hans Frick, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Rudolf Geißendörfer, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Eduard Güntz, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Luz Heller, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Kurt Herzberg, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Ferdinand Hoff, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Peter Holtz, Frankfurt/Main

Privatdozent Hans Joachim Hübener, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Gerhard Kahlau, Frankfurt/Main

Prof. Dr. Richard Mittermaier, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Ernst Friedrich Pfeiffer, Frankfurt/Main

Prof. Dr. phil. nat, Dr. med. h. c., Dr. med. h. c.  
Boris Rajewsky, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Joachim von Reckow, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Bernhard de Rudder, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Dietrich Starck, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Rudolf Thiel, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Karl Wezler, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Ferdinand Wiethold, Frankfurt/Main

Prof. Dr. med. Jürg Zutt, Frankfurt/Main

### Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Vergleichsweise Bestimmung von 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroiden im menschlichen Plasma mit einer kolorimetrischen und einer enzymatischen Methode bei normaler und pathologisch veränderter Nebennierenrindenfunktion",

in der I. Medizinischen Universitätsklinik in Frankfurt/Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Ernst Friedrich Pfeiffer mit Unterstützung durch Herrn Privatdozenten Dr. med. Hans Joachim Hübener, der die enzymatischen Analysen im Institut für Vegetative Physiologie in Frankfurt/Main vorgenommen hat, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Abbildung 3, Seite 32 und Abbildung 6, Seite 35 der vorliegenden Arbeit wurden 1959 von Herrn Prof. Pfeiffer in seinem Vortrag anlässlich der Therapiewoche in Karlsruhe, "Die Bedeutung der Hormonanalysen für Diagnose und Therapie", verwandt.

Groß-Gerau, den 28. 1. 1965

(Eckhard Kollatz)





